

**JP09028391A**

**MicroPatent Report**

**PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN**

<p><b>[71] Applicant:</b> MITSUBISHI CHEM</p> <p><b>[72] Inventors:</b> HATAKEYAMA KAZUHISA; GOTO MAKOTO; TERASAWA MASATO; YUGAWA HIDEAKI</p> <p><b>[21] Application No.:</b> JP07181730</p> <p><b>[22] Filed:</b> 19950718</p> <p><b>[43] Published:</b> 19970204</p> <p><b><u>Go to Fulltext</u></b></p>	<p><b>[No drawing]</b></p>
<p><b>[57] Abstract:</b>  <b>PROBLEM TO BE SOLVED:</b> To inexpensively obtain t-tryptophan in a high efficiency.  <b>SOLUTION:</b> The objective L-tryptophan is successively generated in a reacting solution with keeping pH of the reacting solution at 9-10 and controlling a concentration of generated L- serine in the reacting solution to <math>\leq 50\text{mM}</math> in generating L-tryptophan from glycine, formaldehyde and indole in the co- presence of a microorganism fungus containing serine hydroxymethyl transferase or its treated substance and a microorganism fungus containing tryptophan synthase or tryptophanase or its treated substance.</p> <p><b>[51] Int'l Class:</b> C12P01322 C12N00121 C12N00910 C12N01509 C12N00910 C12R00119</p>	

**BEST AVAILABLE COPY**



(19)日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-28391

(43)公開日 平成9年(1997)2月4日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/22			C 1 2 P 13/22	
// C 1 2 N 1/21		7804-4B	C 1 2 N 1/21	
9/10			9/10	
15/09	Z N A	9162-4B	15/00	Z N A A
(C 1 2 N 9/10				

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-181730	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成7年(1995)7月18日	(72)発明者	畠山 和久 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	後藤 誠 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	寺沢 真人 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L-トリプトファンの製造法

(57)【要約】

【構成】 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファンナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめるに際し、反応液中のpHを9～10に維持し、反応液中の生成L-セリン濃度を50mM以下に制御しながらL-トリプトファンを反応液中に連続的に生成せしめることを特徴とするL-トリプトファンの製造方法。

【効果】 本発明の製造方法により、L-トリプトファンを高効率で安価に製造することが可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめ、反応液よりL-トリプトファンを採取する製造方法。

【請求項2】 反応液中のpHを9~10に維持し、反応液中の生成L-セリン濃度を50mM以下に制御しながらL-トリプトファンを反応液中に連続的に生成せしめることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、L-トリプトファンの製造法に関し、更に詳しくは、原料としてインドール、グリシンおよびホルムアルデヒドを用い、トリプトファンシンターゼとセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの共存下酵素反応を行いL-トリプトファンを生成蓄積せしめる、L-トリプトファンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、L-トリプトファンの酵素的な合成は、トリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼの存在下にインドールとL-セリンを反応させて行なわれている（特公平5-79311、特開平1-51093等）。しかしながら、L-セリンは比較的高価であることから、L-セリン以外の原料を使う方法が検討されている。インドール、グリシンおよびホルムアルデヒドからのL-トリプトファン製造法に関して、酵素反応の第1段階でセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの作用でグリシンとホルムアルデヒドからL-セリンを製造し、次いで第2段階で反応系へインドールを添加し製造する方法が提案されている（特開昭62-502934）。

【0003】しかしながら上記の方法では、反応を2段階に別ける為、操作が複雑であり、製造も回分式に限定されるので決して工業的に有利な方法とは言えない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前述の如く、インドール、グリシンおよびホルムアルデヒドを原料とするL-トリプトファン製造法では工業的に有利な方法は提案されていない。本発明は、上記問題を解決し、従来に比べて効率的かつ安価なL-トリプトファンの製造方法を提供すべくされたものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下

に、インドール、グリシン及びホルムアルデヒドからL-トリプトファンを連続的に効率良くL-トリプトファンを反応液中に生成蓄積せしめ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめ、反応液よりL-トリプトファンを採取する方法を提供するものである。

【0007】さらに、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるトリプトファンシンターゼを含有する微生物としてはインドールとL-セリンからL-トリプトファンを生成し得る能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリ K-12 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ K-12 YK2004 (FERMBP-1732)、エシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERMBP-3244)、パチルス・ズブチリス (Henner, D. J. et al. (1984) Gene, vol. 34, 169~177) プレビバクテリウム・ラクツファーマメンタム (Matsui et al. (1986) Agric. Biol. Chem., Vol. 51, 823~828)、サルモネラ・チフィムリム (Kawasaki, H. et al. (1987) J. Biol. Chem., Vol. 267, 10678~10683)、パチルス・ステアロサーモフィラス 1FO13737、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERMBP-1497) 等が挙げられる。好ましくは、エシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERMBP-3244) が挙げられる。

【0008】また、トリプトファナーゼを含有する微生物としては、インドールとL-セリンからL-トリプトファンを生成しうる能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリ K-12 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ ATCC 25019、エシェリヒア・コリ 1FO3301、エシェリヒア・コリ K-12 YK3002 (FERMBP-1733)、エシェリヒア・コリ K-12 YK3003 (FERMBP-1734)、エシェリヒア・コリ K-12 YK3005 (FERMBP-1736)、シンビオバクテリウム・サーモフィラム (Suzuki, S. et al. (1988) J. Gen. Microbial. 134, 2353) 等が挙げられる。好ましくは、エシェリヒア・コリ K-12 YK3005 (FERMBP-1736) が挙げられる。

【0009】さらに、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物としては、グリシンとホルムアルデヒドからL-セリンを生成しうる能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリ K-12 (ATCC 2732

5)、エシエリヒア・コリ MT-10350 (FERM P-7437、FERM BP-793)、エシエリヒア・コリ MT-10351 (FERM P-7438、FERM BP-794)、ハイホミクロビウム・メチロバラム (Hyphomicrobium methyloborum) GM 2 (特開平6-181776)、ハイホミクロビウム・SP (Hyphomicrobium SP) (FERM-P2236)、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (Corynebacterium glycinophilum) ATCC21341、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (Corynebacterium glycinophilum) AJ3414 (FERM P-1687)、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (Corynebacterium glycinophilum) AJ12401 (FERM P-11606)、プレバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) MJ-233 (FERM BP-1497) 等が挙げられる。好ましくは、プレバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) MJ-233 (FERM BP-1497) が挙げられる。また、これらの菌株のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をエシエリヒア・コリ K-12 (ATCC27325)、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497)、パチルス・サチルス (Chang, S. and Cohen, S. N. Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979)) 等の菌株に組換えた微生物等も、好適に使用できる (特開平2-42994、特開平6-181776等)。

【0010】セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ、あるいは、トリプトファンナーゼを含有する微生物の培養は、それ自体既知の通常用いられる、炭素源、窒素源、無機塩等を含む培地で行うことができる。炭素源としては、例えばグルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムがそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸二水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー、カザミノ酸、ビオチン、チアミン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0011】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気的条件下に、培養温度は一般に20℃～50℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、特に制限するものではないが、通常1～10% (w/v)、更に好ましくは2～5% (w/v) である。また、培養期間は通常約5時間～約5日間である。

【0012】本発明の方法は、上記の如く培養して得た

培養物、該培養物を遠心分離法等により分離して得られる菌体または該菌体の処理物、例えば洗浄菌体、乾燥菌体、あるいはそれらの固定化物等の種々の形態が使用される。また、菌体破砕物、あるいはそれらを抽出・精製して得た酵素または該酵素を固定化した固定化酵素を使用してもよい。

【0013】かくして得られる、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物またはその処理物、および、トリプトファンシンターゼまたはトリプトファンナーゼを含有する微生物またはその処理物の混合物をインドールとグリシンおよびホルムアルデヒドを含有する水溶液中で酵素反応させて、反応液中にL-トリプトファンを生成蓄積せしめることができる。基質であるインドールの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは0.5～2mMである。

【0014】グリシンの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは、1mmol～10molである。ホルムアルデヒドの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは、1mmol～10molである。L-セリンは反応液中のグリシンおよびホルムアルデヒドからセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼにより合成され、反応液中のL-セリン濃度は、液中のグリシンあるいはホルムアルデヒドの濃度あるいはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの酵素量の調節により制御可能である。かくして決定されるL-セリンの反応液中の濃度は、20mM～50mM、好ましくは30mM～50mM、である。反応液には、基質であるインドール、グリシン、および、ホルムアルデヒドの他に、L-トリプトファンの生成率を高めるためにピリドキサールリン (PLP)、テトラヒドロ葉酸 (THF)、および、塩化ナトリウムあるいは塩化カリウムを添加せしめることが好ましい。

【0015】溶媒としては、一般には、水が用いられ、必要に応じてトリトンX-100 (ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル系非イオン性界面活性剤)、ツイーン20 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート系非イオン性界面活性剤) 等の界面活性剤を添加することもできる。反応液中のpHは、9～10であり、pHの調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0016】反応温度は10～55℃、好ましくは、15～45℃である。上記の如く酵素反応させることによりL-トリプトファンを、高濃度で生成蓄積させることができる。さらに、本製造法は、該酵素や微生物を、膜を利用して系内に封じ込め、反応と同時に生成物を含有した透過液を抜き出し、菌体分離を連続的にを行いL-トリプトファンを高濃度に効率よく連続製造することもできる。

【0017】得られたL-トリプトファンの分離・精製は、通常のイオン交換樹脂法、晶析法、その他の公知の

方法を組み合わせることにより、容易に行うことができる。

#### 【0018】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、下記の実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げるものであり、これによって本発明の範囲は何ら限定されるものではない。

【0019】実施例1 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼおよびトリプトファンシンターゼによるL-トリプトファン生成反応における、セリン濃度の影響  
(1) プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地 [組成: 尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ピオチン 200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン 200 $\mu\text{g}$ 、グルコース 20g を蒸留水に溶解して1リットルとする] 1リットル中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。

【0020】得られた菌体をリゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液 [組成: 10mM NaCl、20mM トリス緩衝液 (pH 8.0)、1mM EDTA $\cdot$ 2Na] 15ml に懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10~12℃で20分間、5,000 $\times$ gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分中に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で撪め取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得られたDNAは、溶液 [組成: 10mM トリス緩衝液 (pH 7.5)、1mM EDTA $\cdot$ 2Na] 5mlを加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0021】(B) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片の調製

上記(A)項で調製したプレバクテリウム・フラバムの染色体DNA 25 $\mu\text{g}$ を、制限酵素EcoRI 50 unitと37℃で1時間反応させて切断し、染色体DNAのEcoRI分解物を調製した。この分解物溶液

に、プラスミドpUC118 (宝酒造製) 1 $\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRIと37℃で1時間反応させて得た分解物溶液を混合し、これにそれぞれ最終濃度が50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、およびT4 DNAリガーゼ1 unitとなるように各成分を添加し、16℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。

【0022】得られた溶液を用いて常法 [M. Mandel, A. Higa; J. Mol. Biol., 53, 159 (1970) 参照] に従ってグリシン要求性大腸菌変異株、エシエリヒア・コリAT2457 (glyA) [静岡県三島市谷田1-11 国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センターに系統番号: ME5362として保管されており、同センターから入手可能] を形質転換し、得られた形質転換菌をアンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む選択培地 [組成:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコース 2g、および寒天 16g を蒸留水に溶解して1リットルとする] に塗抹した。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するL培地に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間8,000 $\times$ gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p.90-91 (1982) 参照] によりプラスミドを抽出した。該プラスミドを制限酵素EcoRIで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミドpUC118のEcoRI部位に大きさ約3.8kbのDNA断片の挿入が認められた。

【0023】上記の大きさ約3.8kbの挿入DNA断片をアガロースゲル中より回収し、さらに制限酵素BamHIと制限酵素SmaIとで処理した。この分解物溶液と、プラスミドpUC119 (宝酒造製) を制限酵素BamHIと制限酵素SmaIとで処理して得た分解物溶液を混合し、pH 7.6で10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ の存在下、T4 DNAリガーゼによりDNA分解物を結合させた。

【0024】得られた結合DNA溶液を用いて常法に従って、前記グリシン要求性大腸菌変異株エシエリヒア・コリAT2457を形質転換し、得られた形質転換菌をアンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む前記選択培地に塗抹した。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するL培地 [トリプトン 10g、酵母エキス 5g、塩化ナトリウム 5g および寒天 16g を蒸留水 1リットルに溶解して調製] に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間、8,000 $\times$ gの遠心分離にて菌体を回収した。

【0025】回収した菌体から前記のアルカリ-SDS

法によりプラスミドを抽出し、該プラスミドを制限酵素 BamHI と SmaI とで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミド pUC119 の BamHI-SmaI 部位に大きさ約 2.1 kb の DNA 断片の挿入が認められた。そこで、本プラスミドを pUC119-MJglyA と命名した。

【0026】(C) グリシン要求性大腸菌変異株への相補試験

上記(B)項で調製したプラスミド溶液を用いて前記グリシン要求性大腸菌変異株エシエリヒア・コリ AT245.7 を形質転換したところ、約  $10^5$  細胞/ $\mu$ g DNA の頻度で前記選択培地上に形質転換株を得た。これにより、上記(B)項で調製したプラスミド pUC119-MJglyA の大きさ約 2.1 kb の BamHI-SmaI DNA 断片上にセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれることが確認された。

【0027】(D) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列の決定  
上記実施例1の(C)項でセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼが含まれることが確認された大きさ約 2.1 kb の DNA 断片の塩基配列を下記の操作により決定し、この DNA 断片上に存在するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子の存在部位を特定した。

【0028】大きさ約 2.1 kb の DNA 断片溶液 14  $\mu$ l を制限酵素 Sau3AI を用いて 37℃ で 1~5 分間処理して DNA 断片を部分分解した。また、クローニングベクター pUC118 (宝酒造製) を制限酵素 BamHI で切断した。得られたベクター DNA 断片と部分分解 DNA 断片とを混合し、この混合液にそれぞれ最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、および T4 DNA リガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、ベクター DNA 断片と部分分解 DNA 断片とを結合させた。

【0029】上記と同様に大きさ約 2.1 kb の DNA 断片溶液 14  $\mu$ l を制限酵素 TaqI 50 unit と 5~8 分間反応させて部分分解 DNA 断片を調製した。クローニングベクター pUC118 を制限酵素 AccI で切断した後、これを上記と同様にして部分分解 DNA と結合させた。

【0030】得られたプラスミド混液を用い、常法 [J. Mol. Biol., 53, 159(1970)参照] によりエシエリヒア・コリ JM109 株 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリンを 50  $\mu$ g 含む前記の L 培地に塗抹した。上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA を用いて、ベクター pUC118 に挿入された部分分解 DNA 断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法 [dideoxy chain termination method, S

anger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977) 参照] により決定した。

【0031】具体的には、上記培養物より抽出したプラスミド DNA をパーキン・エルマー社製カタリスト 800 モレキュラー・バイオロジー・ラボステーション (CATALYST 800 Molecular Biology Labstation; Perkin-Elmer) を用いてプロトコールに従い反応させた後、パーキン・エルマー社製 373A DNA シークエンサーにより各々のプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列を決定した。そして、これらの個々の配列の連結は、パーキン・エルマー社製のシークエンス解析ソフト インヘリット (INHERIT) を用いて行い、大きさ約 2.1 kb の DNA 断片の全塩基配列を決定した。その配列を後記配列表の配列番号: 1 に示す。

【0032】決定した塩基配列中にはオープンリーディングフレームの存在が認められ、既知のエシエリヒア・コリの glyA 遺伝子との相同性の比較により、それがプレバクテリウム・フラバム MJ-233 の glyA 遺伝子 (塩基番号 556~1857) であることが判明した。

【0033】(E) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現ベクターの構築

上記(B)項で調製したプラスミド pUC119-MJglyA を、制限酵素 BamHI と SmaI で切断し、その切断断片をアガロース電気泳動に供した後、約 2.1 kb の DNA 断片を Gene Clean II (ファコシ製) を用いて抽出した。得られた DNA 断片を、DNA Blunting Kit (宝酒造製) を用いて平滑末端化処理した後、制限酵素 SmaI で切断した発現ベクター pKK223-3 (ファルマシア製) と T4 DNA リガーゼにより結合させた。得られた結合 DNA 溶液を用いて常法に従ってエシエリヒア・コリ JM109 株 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリンを 50  $\mu$ g 含む前記の L 培地に塗抹した。

【0034】上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素 BamHI および PstI とで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミド pKK223-3 の約 4.6 kb のベクター中に、約 2.1 bp の前記 DNA 断片が、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのオープンリーディングフレームが pKK223-3 の tac プロモーターと同じ方向となるように挿入されていることが確認された。そこで、本プラスミドを pKK223-3-MJglyA と命名した。得られたプラスミド pKK223-3-MJglyA 溶液を、常法に従ってエシエリヒア・コリ K-12 株 (ATCC 27325) を形質転換し、アンピシリンを 50  $\mu$ g 含む前記の L 培地に塗抹した。上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出

し、該プラスミドを制限酵素BamHIおよびPstIとで切断した。その結果、本形質転換株は、pKK223-3-MJglyAを含有することが確認された。そこで、本菌株をエシェリヒア・コリ K-12 SH1001株と命名した。

【0035】(2) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物の調整

MTP培地〔組成； $K_2HPO_4$  7g、 $KH_2PO_4$  2g、 $(NH_4)_2SO_4$  1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1g、アデニン塩酸塩 50mg、酵母エキス 1g、トリプトン 1g、グルコース 1.0g、蒸留水 1L、pH7.2〕50mlを500ml容三角フラスコ4本に分注し、120℃で15分間滅菌処理したものにエシェリヒア・コリ K-12 SH1001株を植菌し、37℃にて1日振とう培養後、同様にして調製したMTP培地1.0Lを分注した5L容三角フラスコ15本に、10mlの培養液を接種し、37℃にて12時間振とう培養した。また、培養開始3時間後に培地中にインドールアクリル酸100mgを添加した。遠心分離を用いて菌体を回収し、-20℃で2日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0036】(3) トリプトファンシンターゼを含有する微生物の調整

MTP培地〔組成； $K_2HPO_4$  7g、 $KH_2PO_4$  2g、 $(NH_4)_2SO_4$  1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1g、アデニン塩酸塩 50mg、酵母エキス 1g、トリプトン 1g、グルコース 1.0g、蒸留水 1L、pH7.2〕50mlを500ml容三角フラスコ4本に分注し、120℃で15分間滅菌処理したものにエシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERM BP-3244) 株を植菌し、37℃にて1日振とう培養後、同様にして調製したMTP培地1.0Lを分注した5L容三角フラスコ15本に、10mlの培養液を接種し、37℃にて12時間振とう培養

した。また、培養開始3時間後に培地中にインドールアクリル酸100mgを添加した。遠心分離を用いて菌体を回収し、-20℃で2日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0037】(4) L-トリプトファン生成反応

実施例1の(1)および(2)で調製したエシェリヒア・コリ K-12 SH1001の凍結菌体100gおよびエシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERM BP-3244) 株の凍結菌体の100gを、インドール 0.1g、グリシン 7.5g、ホルマリン (ホルムアルデヒド含量 37%) 1.6g、PLP 100mg、THF 1.0g、NaCl 2.3gを含有する反応液500ml (pH9.5に25%アンモニアで調整)に懸濁した後、全体の体積を水で1000mlに調整した。本懸濁液をそれぞれ3Lジャーファーマンター (エイブル社製)に仕込み、30℃で攪拌しながら反応を行った。反応中、反応液のpHを25%アンモニアで9.5に調整した。また、反応液中のインドール濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターしながらインドールの濃度が2mMを越えないようにインドールを連続的あるいは断続的に添加した。さらに、反応液中のL-セリン濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターしながら第1表に示す各実験区の指定L-セリン濃度を超えることなくL-セリン濃度を保てるようにグリシンおよびホルムアルデヒドを連続的あるいは断続的に添加し、総量として22.5gのグリシンを添加した。反応液中のL-トリプトファン濃度は高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターした。その結果、反応終了後のL-トリプトファンの、反応液中に添加したグリシンに対する収率 (mol%)を第1表に示す。

【0038】

【表1】

第1表	
反応液中のL-セリン濃度	L-トリプトファンの対グリシン収率
(mM)	(%)
10	95
20	96
30	95
50	95
70	85
100	80

【0039】次に、L-セリン濃度30mMで反応した反応終了液500mlにNaOH水溶液を加えてpH10にしたのち、アンモニア型強酸性イオン交換樹脂 (ダイヤイオンSK-1B、三菱化成製)のカラムを通してL-トリプトファンの粗結晶を析出させたのち、これをアセトンで洗浄し乾燥してL-トリプトファンの結晶16.5gを得た。

【0040】実施例2 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼおよびトリプトファンナーゼによるL-トリプトファン生成反応

(1) トリプトファンナーゼ含有菌の調整

実施例1の(3)と同様にしてエシェリヒア・コリ K-12 YK3005 (FERM BP-1736) 株を培養した後、遠心分離を用いて菌体を回収し、-20

℃で2日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0041】(2) L-トリプトファン生成反応  
実施例1の(2)および実施例2の(1)で調製したエシェリヒア・コリ K-12 SH1001の凍結菌体100gおよびエシェリヒア・コリ K-12YK3005 (FERM BP-1736)株の凍結菌体の100gを、インドール 0.1g、グリシン 7.5g、ホルマリン (ホルムアルデヒド含量37%) 1.6g、PLP 100mg、THF 1.0g、KCl 3.8gを含有する反応液500ml (pH9.5に25%アンモニアで調整)に懸濁した後、全体の体積を水で1000mlに調整した。本懸濁液をそれぞれ3Lジャーファーメンター (エイブル社製)に仕込み、30℃で攪拌しながら反応を行った。反応中、反応液のpHを25%アンモニアで9.5に調整した。また、反応液中

のインドール濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターしながらインドールの濃度が2mMを越えないようにインドールを連続的あるいは断続的に添加した。さらに、反応液中のL-セリン濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターしながら第2表に示す各実験区の指定L-セリン濃度を超えることなくL-セリン濃度を保てるようにグリシンおよびホルムアルデヒドを連続的あるいは断続的に添加し、総量として22.5gのグリシンを添加した。反応液中のL-トリプトファン濃度は高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製)を用いてモニターし、L-トリプトファンの対グリシン収率を求めた結果を第2表に示す。

【0042】

【表2】

第2表

反応液中のL-セリン濃度 (mM)	L-トリプトファンの対グリシン収率 (%)
10	95
20	96
30	95
50	95
70	85
100	80

【0043】L-セリン濃度30mMで反応した反応終了液500mlにNaOH水溶液を加えてpH10にしたのち、アンモニア型強酸性イオン交換樹脂 (ダイイオンSK-1B、三菱化成製)のカラムを通してL-トリプトファンの粗結晶を析出させたのち、これをアセトンで洗浄し乾燥してL-トリプトファンの結晶16.7gを得た。

【0044】

【発明の効果】本発明の製造方法により、L-トリプトファンを高効率で安価に製造することが可能になる。

【0045】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2104

配列

```
GGATCCCGCG ACACCAATGA CAAACGGCAC AGAGGTGGAG GGGGAAGTTC CGAGGAAGGT 60
TTCGGTGGCT GCGGTAAGTT GCTGTGGGCG CGCTACCTGG AGGTGAATCA GACGGGACAG 120
CGGAAGGTAG ACTTCTGCCA CTTACGCGAG GTCAATGTTT TCTCCGATGC CTCGAAGTTC 180
AATGACTTCT TTTTGGGTCA GCACCTGAGG CATTGAGTTT CTCAGCTCGC GCCATTGTGC 240
GCGGTGAAA TCAAGGTAGG GGCTGAAATC TGGTGTGGT GGGGAAGGTT TCACCCAGT 300
TGTGCTTGCA GCGTTTGTCT CTGCCATGAA TCATTGTGC ACCTTAGCTA CTCATTAGT 360
GTGATGGGG TTATTTTTC ACTTCAATGG GTGGCTAAAA GACGTGGGCA CGTGAGTAAA 420
CTCATGGCG CGAAACGATG GAAGTGAACC CATACTTTTA TATATGGTA TCGGCGGTCT 480
ATGCTTGTGG GCGTACCTGT CCGCGAGTG AGGTCTTACG CGCGGGATTG GTCTTGTGAA 540
AGGTTAGCTG ACCTG ATG ACC GAT GCC CAC CAA GCG GAC GAT GTC CGT TAC 591
```

Met Thr Asp Ala His Gln Ala Asp Asp Val Arg Tyr

鎖の数：二本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：ブレヴィバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)

株名：MJ-233

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：556-1857

特徴を決定した方法：E

【0046】



	1	5	10	
CAG CCA CTG AAC GAG CTT GAA CCT GAG GTG GCT GCT GCC ATC GCT GGG				639
Gln Pro Leu Asn Glu Leu Glu Pro Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly				
	15	20	25	
GAA CTT GCC CGT CAA CGC GAT ACA TTA GAG ATG ATC GCG TCT GAG AAC				687
Glu Leu Ala Arg Gln Arg Asp Thr Leu Glu Met Ile Ala Ser Glu Asn				
	30	35	40	
TTC GTT CCC CGT TCT GTT TTG CAG GCG CAG GGT TCT GTT CTT ACC AAT				735
Phe Val Pro Arg Ser Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Asn				
	45	50	55	60
AAG TAT GCC GAG GGT TAC CCT GGC CGC CGT TAC TAC GGT GGT TGC GAA				783
Lys Tyr Ala Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr Gly Gly Cys Glu				
	65	70	75	
CAA GTT GAC ATC ATT GAG GAT CTT GCA CGT GAT CGT GCG AAG GCT CTC				831
Gln Val Asp Ile Ile Glu Asp Leu Ala Arg Asp Arg Ala Lys Ala Leu				
	80	85	90	
TTC GGT GCA GAG TTC GCC AAT GTT CAG CCT CAC TCC GGC GCG CAG GCT				879
Phe Gly Ala Glu Phe Ala Asn Val Gln Pro His Ser Gly Ala Gln Ala				
	95	100	105	
AAT GCT GCT GTG CTG ATG ACT TTG GCT GAG CCA GGC GAC AAG ATC ATG				927
Asn Ala Ala Val Leu Met Thr Leu Ala Glu Pro Gly Asp Lys Ile Met				
	110	115	120	
GGT CTG TCT TTG GCT CAT GGT GGT CAC TTG ACC CAC GGA ATG AAG TTG				975
Gly Leu Ser Leu Ala His Gly Gly His Leu Thr His Gly Met Lys Leu				
	125	130	135	140
AAC TTC TCC GGA AAG CTG TAC GAG GTT GTT GCG TAC GGT GTT GAT CCT				1023
Asn Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Glu Val Val Ala Tyr Gly Val Asp Pro				
	145	150	155	
GAG ACC ATG CGT GTT GAT ATG GAT CAG GTT CGT GAG ATT GCT CTG AAG				1071
Glu Thr Met Arg Val Asp Met Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Leu Lys				
	160	165	170	
GAG CAG CCA AAG GTA ATT ATC GCT GGC TGG TCT GCA TAC CCT CGC CAC				1119
Glu Gln Pro Lys Val Ile Ile Ala Gly Trp Ser Ala Tyr Pro Arg His				
	175	180	185	
CTT GAT TTC GAG GCT TTC CAG TCT ATT GCT GCG GAA GTT GGC GCG AAG				1167
Leu Asp Phe Glu Ala Phe Gln Ser Ile Ala Ala Glu Val Gly Ala Lys				
	190	195	200	
CTG TGG GTC GAT ATG GCT CAC TTC GCT GGT CTT GTT GCT GCT GGT TTG				1215
Leu Trp Val Asp Met Ala His Phe Ala Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu				
	205	210	215	220
CAC CCA AGC CCA GTT CCT TAC TCT GAT GTT GTT TCT TCC ACT GTC CAC				1263
His Pro Ser Pro Val Pro Tyr Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Val His				
	225	230	235	
AAG ACT TTG GGT GGA CCT CGT TCC GGC ATC ATT CTG GCT AAG CAG GAG				1311
Lys Thr Leu Gly Gly Pro Arg Ser Gly Ile Ile Leu Ala Lys Gln Glu				
	240	245	250	
TAC GCG AAG AAG CTG AAC TCT TCC GTA TTC CCA GGT CAG CAG GGT GGT				1359
Tyr Ala Lys Lys Leu Asn Ser Ser Val Phe Pro Gly Gln Gln Gly Gly				
	255	260	265	
CCT TTG ATG CAC GCA GTT GCT GCG AAG GCT ACT TCT TTG AAG ATT GCT				1407

Pro Leu Met His Ala Val Ala Ala Lys Ala Thr Ser Leu Lys Ile Ala  
 270 275 280  
 GGC AAT GAG CAG TTC CGT GAC CGT CAG GCT CGC ACG TTG GAG GGT GCT 1455  
 Gly Asn Glu Gln Phe Arg Asp Arg Gln Ala Arg Thr Leu Glu Gly Ala  
 285 290 295 300  
 CGC ATT CTT GCC GAG CGT CTG ACT GCT TCT GAT GCG AAG GCC GCT GGC 1503  
 Arg Ile Leu Ala Glu Arg Leu Thr Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala Gly  
 305 310 315  
 GTG GAT GTC TTG ACC GGT GGC ACT GAT GTG CAC TTG GTT TTG GCT GAT 1551  
 Val Asp Val Leu Thr Gly Gly Thr Asp Val His Leu Val Leu Ala Asp  
 320 325 330  
 CTG CGT AAC TCC CAG ATG GAT GGC CAA CAG GCG GAA GAT CTG CTG CAC 1599  
 Leu Arg Asn Ser Gln Met Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asp Leu Leu His  
 335 340 345  
 GAG GTT GGT ATC ACT GTG AAC CGT AAC GCG GTT CCT TTC GAT CCT CGT 1647  
 Glu Val Gly Ile Thr Val Asn Arg Asn Ala Val Pro Phe Asp Pro Arg  
 350 355 360  
 CCA CCA ATG GTT ACT TCT GGT CTG CGT ATT GGT ACT CCT GCG CTG GCT 1695  
 Pro Pro Met Val Thr Ser Gly Leu Arg Ile Gly Thr Pro Ala Leu Ala  
 365 370 375 380  
 ACC CGT GGT TTC GAT ATT CCT GCA TTC ACT GAG GTT GCA GAC ATC ATC 1743  
 Thr Arg Gly Phe Asp Ile Pro Ala Phe Thr Glu Val Ala Asp Ile Ile  
 385 390 395  
 GGT ACT GCT TTG GCT AAT GGT AAG TCC GCA GAC ATT GAG TCC CTG CGT 1791  
 Gly Thr Ala Leu Ala Asn Gly Lys Ser Ala Asp Ile Glu Ser Leu Arg  
 400 405 410  
 GGC CGT GTA GCA AAG CTT GCT GCA GAT TAC CCA CTG TAT GAG GGC TTG 1839  
 Gly Arg Val Ala Lys Leu Ala-Ala-Asp-Tyr Pro Leu Tyr Glu Gly Leu  
 415 420 425  
 GAA GAC TGG ACC ATC GTC TAAGCTTTTC TTGAGTTTT CATATGTAGA 1887  
 Glu Asp Trp Thr Ile Val  
 430 434  
 AGGCATCGTC GGCTTCGGCC TGGCGGTGCT TTTCTCGTTG TTTGTGGTT TTGTCAGAGG 1947  
 ATGTCATGCG CGTTTAAATT ATTGATAATT ATGATTCTTT CACGTTAAT CTGCGCACCT 2007  
 ATGTGAAGA GGTACGGGT CAGGCACCTG TGGTGGTGCC TAATGATCAA GAAATAGATG 2067  
 AGACGCTTTT CGACGCCGTC ATCCTCTCAC CGGGCCC 2104

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号

三菱化学株式会社筑波総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**